

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
28. Februar 2002 (28.02.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/16573 A2**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/00 Claus [DE/DE]; Kantstrasse 22, 10623 Berlin (DE).  
SCHMIDT-ULLRICH, Ruth [DE/DE]; Leberstrasse 17,  
10829 Berlin (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/03158
- (22) Internationales Anmeldedatum: 24. August 2001 (24.08.2001) (74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; Robert-Rössle-Str. 10,  
13125 Berlin (DE).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (81) Bestimmungsstaat (national): US.
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT,  
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,  
NL, PT, SE, TR).
- (30) Angaben zur Priorität: 100 41 842.2 25. August 2000 (25.08.2000) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKU-  
LARE MEDIZIN [DE/DE]; Robert-Rössle-Str. 10, 13125  
Berlin (DE).
- Veröffentlicht: — ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHEIDEREIT, Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: GENETICALLY MODIFIED, NON-HUMAN MAMMAL CONTAINING AN ADDITIONAL INDUCIBLE REGU-  
LATOR GENE

(54) Bezeichnung: GENETISCH VERÄNDERTES, NICHT-MENSCHLICHES SÄUGETIER, DAS EIN ZUSÄTZLICHES IN-  
DUZIERBARES REGULATOR-GEN ENTHÄLT

(57) Abstract: The invention relates to a transgenic, non-human mammal, preferably a mouse, the body and sex cells thereof containing an inducible regulator gene which can be expressed in all cells. The biological activity of the regulator gene is only obtained after crossing with an animal having a recombinase (Cre) gene. Said regulator gene contains a stop codon situated before the translation starting site and flanked by loxP elements, in order to ensure the Cre-dependent expression thereof. The regulator gene is transmitted to the original animal by means of transfection, homologous recombination of embryonic stem cells and ensuing blastocyst micro-injection.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein transgenes, nicht-menschliches Säugetier, vorzugsweise eine Maus, dessen Körper- und Geschlechtszellen ein induzierbares Regulatorgen enthalten, welches in allen Zellen exprimiert werden kann. Die biologische Aktivität des Regulatorgens wird nur nach Kreuzung mit einem Rekombinase (Cre) - Gen-tragenden Tier erhalten. Das Regulatorgen enthält zur Gewährleistung seiner Cre-abhängigen Expression ein von loxP Elementen flankiertes Stop Kodon vor der Translations-Startstelle. Das Regulatorgen wurde dem Ursprungstier durch Transfektion und homologe Rekombination embryonaler Stammzellen und nachfolgender Blastozystenmikroinjektion übertragen.

WO 02/16573 A2

## **Genetisch verändertes, nicht-menschliches Säugetier, das ein zusätzliches induzierbares Regulator-Gen enthält**

### **Beschreibung**

Die Erfindung betrifft ein transgenes, nicht-menschliches Säugetier, vorzugsweise eine Maus, dessen Körper- und Geschlechtszellen ein induzierbares Regulatorgen enthalten, welches in allen Zellen exprimiert wird. Das Genprodukt des Regulatorgens supprimiert die Aktivität von NF- $\kappa$ B Transkriptionsfaktoren. Vorzugsweise kodiert das Regulatorgen eine mutierte Form des natürlichen NF- $\kappa$ B Inhibitors I $\kappa$ B $\alpha$ , der aminoterminalen Degradationssignale fehlen. Dieses I $\kappa$ B $\alpha$  Mutanten-Protein, I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N, bindet an zelluläre NF- $\kappa$ B Proteine und hält diese in einem inaktiven Zustand. Im Gegensatz zu dem natürlichen I $\kappa$ B $\alpha$ , welches nach zellulärer Stimulierung mit einer Vielzahl unterschiedlicher NF- $\kappa$ B aktivierender Signalstoffe degradiert wird und NF- $\kappa$ B dadurch freisetzt, bleibt I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N stabil und blockiert damit eine NF- $\kappa$ B Freisetzung.

Das genetisch veränderte Säugetier wird durch eine Kombination der homologen Rekombinationstechnik und des Cre-Lox Systems erhalten. Bei der Cre-Lox-Methode wird die Cre Rekombinase des P1 Bakteriophagen verwendet, die an zwei benachbarte spezifische kurze DNA Sequenzen, den loxP Stellen, bindet. Nach Bindung an die loxP Sequenzen spaltet Cre beide Sequenzen nukleolytisch und fügt die Enden unter Verlust der dazwischen liegenden DNA Sequenzen wieder zusammen.

Homologe Rekombinations-Technologien sind an sich bekannt und sind z.B. in Hogan et al., 1994, beschrieben. Die Cre-Lox Technologie zur Erzeugung konditionaler Geninaktivierung ist ebenfalls an sich bekannt und als Methode im Detail erläutert (Gu et al., 1994; DiSanto et al., 1995; Schwenk et al., 1995). Des weiteren liegen bereits zahlreiche Patente zur Herstellung transgener, nicht-menschlicher Säugetiere vor, wie z.B. die sogenannte Krebsmaus (US-PS 4,736,866)

Die biologische Aktivität des NF- $\kappa$ B Regulatorgens wird nur nach Kreuzung mit einem Rekombinase (Cre) - exprimierenden Tier erhalten. Das Regulatorgen enthält zur Gewährleistung seiner Cre-abhängigen Expression ein von loxP Elementen flankiertes Stop Kodon vor der Translations-Startstelle. Ein translatierbares Transkript kann also nur nach Cre-vermittelter Rekombination erhalten werden. Das Regulatorgen wurde dem Ursprungstier

durch Transfektion und Rekombination embryonaler Stammzellen und deren Injektion in Blastozysten übertragen. Anwendungsgebiete der erfindungsgemäßen Tiere liegen in der medizinischen, der pharmazeutischen und der biologischen Grundlagen- und anwendungsorientierten Forschung und Diagnose.

Genetisch veränderte Tiere lassen sich durch den Prozess homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen (ES), gefolgt von Injektion der so modifizierten Stammzellen in Blastozysten, erzeugen. Bei der homologen Rekombination wird ein normales Gen durch ein künstlich verändertes Gen durch den Rekombinationsvorgang ersetzt. Häufig wird diese Methode angewendet, um Gene durch die Rekombination völlig zu inaktivieren und deren Funktion nachfolgend zu bestimmen. Hierbei wird in der Regel ein Targetingkonstrukt verwendet, welches den Leserahmen des Gens entweder durch Einfügen eines vorzeitigen Stopp-Kodons oder durch Ersetzen der kodierenden exonischen Sequenz durch ein Markerprotein zerstört. Homologe Rekombination wird jedoch auch verwendet, um gezielt Punktmutationen in ein endogenes Gen einzufügen, wobei der im Targetingkonstrukt enthaltende Gen-Anteil eben nur in einer spezifischen Position verändert wird. Zunächst werden nach Transplantation der mit rekombinanten ES Zellen mikroinjizierten Blastozysten in Muttertiere chimäre Nachkommen erhalten. Diese Nachkommen tragen die eingefügte Gen-Veränderung nur auf einem der beiden Allele. Homozygote Tiere werden durch weitere Paarung erhalten.

Homologe Rekombination wird im Rahmen dieser Erfindung eingesetzt, um ein künstlich verändertes Gen (vorzugsweise  $I\kappa B\alpha\Delta N$ ) in ein Allel eines zellulären Gens (hier  $\beta$ -Catenin) so zu inserieren, daß es die gleiche ubiquitäre Expression wie das zelluläre Gen (z.B.  $\beta$ -Catenin) erlangt, den Leserahmen des zellulären Gens jedoch zerstört. Die Tiere werden nur heterozygot gehalten, da homozygote Inaktivierung des endogenen Gens (z.B.  $\beta$ -Catenin) letal ist (Haegel et al., 1995, Hülsken et al., 2000). Die Expression des veränderten Genlokus ist auf mRNA Ebene ständig gewährleistet, die mRNA kann jedoch wegen der eingefügten loxP-Stopp-loxP Kasette nicht in ein funktionelles Protein übersetzt werden. Daher bleiben die Tiere frei von Symptomen und sind nach phänotypischen Merkmalen von den Wildtyp-Tieren nicht zu unterscheiden.

Um das künstlich veränderte Gen in eine biologisch aktive Form zu bringen, muß das Tier mit einem anderen Tier gekreuzt werden, welches ein transgenes Tier ist und die Cre-

Rekombinase als zusätzliches Gen enthält. Dieses zweite Tier kann die Cre-Rekombinase entweder unter Kontrolle eines ubiquitär aktiven Promoters exprimieren, oder unter Kontrolle eines gewebs- oder zellspezifischen Promoters. Die Cre-Rekombinase kann weiterhin durch einen künstlich induzierbaren Promoter reguliert sein. Hierfür stehen Tetrazyklin-regulierte Promotoren zur Verfügung. Weiterhin stehen Cre-Rekombinase-Fusionen mit Steroidbindungs-Domänen von Östrogen oder Progesteron-Rezeptoren zur Verfügung, oder werden entwickelt, die durch synthetische Steroidderivate aktiviert werden (z.B. Tamoxifen oder Progesteron-Derivate). Hier führt der Steroidrezeptor-Fusionsanteil zu einer Repression der enzymatischen Aktivität von Cre, die nach Steroidbindung aufgehoben wird.

Die aus der Paarung von  $\text{loxP}|\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$  Tieren und Cre Mäusen erhaltenen Nachkommen exprimieren dann das künstlich veränderte Gen (vorzugsweise  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ ), welches durch Cre aktiviert wurde, in biologisch aktiver Form entweder ubiquitär, oder in bestimmten Zelltypen, Geweben oder Organen. In diesen Fällen ist die Expression während der Embryonalentwicklung bereits gewährleistet und dauert über die gesamte Lebensspanne des Tiers an. Im Fall der induzierbaren Cre-Rekombinasen wird das künstlich veränderte Gen in biologisch inaktiver Weise gehalten, bis durch Zugabe des induzierenden Agens (z.B. Tetrazyklin, Tamoxifen, oder Progesteron-Derivate) Cre dereprimiert wird. Hierbei wird ermöglicht, das künstlich veränderte Gen zu einem gewünschten Zeitpunkt in biologisch aktiver Form zu exprimieren. Die Induktion kann entweder zu einem Zeitpunkt während der Embryonalentwicklung oder im erwachsenen Tier erfolgen.

Der Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, ein genetisch verändertes Tier zur Verfügung zu stellen, welches geeignet ist, detaillierte Untersuchungen zur Pathogenese von Erkrankungen zu erlauben, bei denen die Transkriptionsfaktoren der NF- $\kappa$ B Multigen-Familie beteiligt sind. Diese Erkrankungen schließen ein weites Spektrum von Autoimmun- und Entzündungserkrankungen ein, wie Organabstoßung, multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis, Psoriasis und andere Dermatosen, Asthma, Morbus Crohn und Artherosclerose. NF- $\kappa$ B ist weiter involviert bei septischem Schock, Infektion mit Parasiten und Bakterien und bei der Replikation pathogener Viren, wie z.B. HIV (Wulczyn et al., 1996; Barnes and Karin, 1997; Hatada et al, 2000). Wegen seiner anti-apoptotischen sowie zellteilungs-aktivierenden Wirkungen erlangt NF- $\kappa$ B bei der Resistenz von Tumoren gegen Chemo- oder Radiotherapie als mögliches therapeutisches Target eine generelle Bedeutung (Wang et al., 1999). NF- $\kappa$ B ist

zudem bei der Pathogenese bestimmter Lymphome (z.B. Morbus Hodgkin) und Leukämien als Onkogen wirksam (Mayo and Baldwin, 2000). Es ist anzunehmen, daß bei noch weiteren Erkrankungen verschiedenster Art eine wichtige Funktion von NF- $\kappa$ B nachgewiesen wird. Die Zur-Verfügung-Stellung des genetisch veränderten Tiermodells soll die Entwicklung und Testung von Pharmaka und diagnostischen Mitteln aller Art ermöglichen und erleichtern. Von der Erfindung sollen neue Impulse für die Untersuchung und Therapie NF- $\kappa$ B assoziierter Erkrankungen aller Art ausgehen.

Die Aufgabe wird mit einem genetisch veränderten, nicht-menschlichen Säugetier, insbesondere einem Kleinsäuger, wie Maus oder Ratte, erzielt, welche ein zusätzliches NF- $\kappa$ B Regulator-Gen trägt. Anwendungsgebiete der erfindungsgemäßen Tiere liegen also in der medizinischen, pharmazeutischen und biologischen Grundlagenforschung, sowie in anwendungsorientierter Forschung und Diagnose.

Mit der Verwendung der erfindungsgemäßen Tiere können bislang durchgeführte Tierversuche an höheren Tieren oder an Freiwilligen wesentlich eingeschränkt werden. Die erfindungsgemäßen Tiere werden für die Neu- und Weiterentwicklung therapeutischer und diagnostischer Methoden und zur Prüfung der Verwendungsfähigkeit von Arzneimitteln zur Therapie und Diagnostik NF- $\kappa$ B assoziierter Erkrankungen dienen. Insbesondere haben die erfindungsgemäßen Tiere einen hohen Wert für Bestimmung der therapeutischen Nützlichkeit NF- $\kappa$ B reprimierender Substanzen (Target-Validierung). Es können für beliebige Verabreichungsmodalitäten (systemisch, Organ/Gewebe-limitiert, während der Embryogenese oder im erwachsenen Organismus) und Einwirkungszeiten potentieller NF- $\kappa$ B inhibierender Substanzen die zu erwartenden physiologischen Nebenwirkungen bestimmt werden.

Anschließend wird die Erfindung näher erläutert.

### **Herstellung der genetisch modifizierten Tiere**

Die I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N cDNA mit den kodierenden Sequenzen für Aminosäuren 71–317 von I $\kappa$ B $\alpha$  (Krappmann, 1996) wurde im korrekten Leserahmen in den  $\beta$ -Catenin Targeting Vektor (Huelsken, 2000) kloniert. Für loxP-I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N wurden zwei loxP Sequenzen, Bindungsstellen für die Cre Rekombinase, in den Leserahmen mit dem Startkodon des  $\beta$ -Catenin Gens

kloniert (Abb. 1A). Die loxP Sequenzen flankieren ein Stopkodon, welches eine Expression von translatierbarer I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N mRNA verhindert. loxP-I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N Mäuse werden mit Transgenen Cre Tieren gepaart. Die loxP Sequenzen stammen aus dem Plasmid pAMA (Zhang, 1996). Heterozygote  $\beta$ -cat<sup>w.t.</sup>/ $\beta$ -cat<sup>I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N</sup> (oder  $\beta$ -cat<sup>w.t.</sup>/ $\beta$ -cat<sup>loxP $\Delta$ N</sup>) 129/OLA ES Zellen wurden durch Elektroporation hergestellt. Zwei unabhängige heterozygote ES Zellklone eines jeden Targeting Konstruktes wurden jeweils für Blastozysten-Injektionen zur Erzeugung chimärer Mäuse verwendet. Heterozygote Tiere wurden durch Züchtung mit C57Bl/6 Mäusen erhalten. Tiere mit ausreichend hohem C57Bl/6 Hintergrund wurden für weitere Untersuchungen verwendet. Nach der Geburt waren die I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N Tiere sofort phänotypisch erkennbar. loxPI $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N Mäuse wurden durch PCR identifiziert.

### Charakterisierung der genetisch modifizierten Tiere

Durch homologe Rekombination erhaltene ES Zellklone, die gemäß Southern Blot Analysen I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N- oder loxPI $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N-positiv waren, wurden in Western Blot Analysen auf I $\kappa$ B $\alpha$  und I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N Protein-Expression untersucht (Abb. 1B). Wie erwartet, exprimieren nur I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N-positive ES Zellen das I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N Protein. loxPI $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N positive ES Zellen exprimieren kein I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N, da keine Cre-vermittelte Rekombination erfolgte. Die Effizienz der I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N-vermittelten Inhibition der NF- $\kappa$ B DNA Bindungsaktivität wurde in Gel-Retardierungs-Assays untersucht (Abb. 1C). Während NF- $\kappa$ B p50-p65 Bindungsaktivität in loxPI $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N positiven ES Zellen durch PMA induziert werden konnte, konnte keine induzierte Bindungsaktivität in I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N positiven ES Zellen festgestellt werden (Abb. 1C). I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N- und loxPI $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N ES Zellklone wurden dann verwendet, um chimäre Mäuse durch Blastozysten-Injektion zu erzeugen. Heterozygote Mäuse wurden durch nachfolgendes Kreuzen der Chimären mit C57Bl/6 Wildtyp Tieren erhalten. Wie erwartet wurde I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N Protein in I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N Mäusen in allen untersuchten Geweben exprimiert. Embryonale Fibroblasten (MEF) wurden dann aus I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N Tieren isoliert und auf Induktion von NF- $\kappa$ B durch Zytokine untersucht (Abb. 1D). Die TNF $\alpha$ -induzierte NF- $\kappa$ B DNA Bindungsaktivität war stark unterdrückt, während IL-1 $\beta$  -induzierte Aktivität völlig inhibiert war (Abb. 1D). Das endogene I $\kappa$ B $\alpha$  Protein der MEF wurde nach IL-1 $\beta$  oder TNF $\alpha$  Stimulation degradiert,

während, wie erwartet, das  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$  Protein, dem Degradationssignale fehlen, stabil blieb (Abb. 1E).

Das  $\beta$ -Catenin Gen wird ubiquitär und während der gesamten Embryonalentwicklung exprimiert. Da  $\beta$ -Catenin vorwiegend auf Ebene der Proteinstabilität reguliert wird (Hülksen et al. 2000), blieben die  $\beta$ -Catenin Proteinmengen in allen untersuchten Geweben und in MEF aus  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ -positiven Mäusen in gleicher Höhe wie in Wildtyp Tieren (Abb. 1E und nicht gezeigte Daten). Die Inaktivierung eines der beiden  $\beta$ -Catenin Allele hat also keinen Effekt auf die  $\beta$ -Catenin Proteinexpression.

Diese molekularen Daten weisen also nach, daß  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$  aus dem  $\beta$ -Catenin Lokus ubiquitär exprimiert wird und NF- $\kappa\text{B}$  effizient reprimiert und daß das  $\text{loxPI}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$  Konstrukt ohne Cre Rekombination kein  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$  exprimiert. Ferner wird  $\beta$ -Catenin Protein-Expression durch die mono-allelische Integration nicht beeinflußt.

Die  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$  Mäuse weisen eine Reihe von pathologischen Merkmalen auf (Tabelle 1), von denen nur wenige von bisherigen Knockout Mäusen der verschiedenen NF- $\kappa\text{B}$  Untereinheiten bekannt sind (Gerondakis et al. 1999).

Die  $\text{loxPI}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$  Mäuse können jedoch phänotypisch nicht von Wildtyp-Mäusen unterschieden werden (Tabelle 1). Daher sind alle Phänotypen, die nach  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$  Expression beobachtet werden, auf das  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$  Protein und nicht auf Veränderungen des  $\beta$ -Catenin Lokus zurückzuführen. Wenn  $\text{loxPI}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$  Mäuse jedoch mit deleter-Cre Mäusen (Schwenk et al., 1995), die das Cre Enzym ubiquitär in allen Körperzellen exprimieren, gepaart werden, zeigen die Nachkommen den gleichen Phänotyp wie  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$  Mäuse (Tabelle 1). Das  $\text{loxPI}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$  Konstrukt läßt sich also effizient durch Cre aktivieren. Hiermit ist sichergestellt, daß  $\text{loxPI}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$  Mäuse sich für weitere Untersuchungen eignen, bei denen beliebige andere Cre-Mäuse verwendet werden, bei denen Cre in unterschiedlichster Art und Weise exprimiert wird.

**Tabelle I.** Pathophysiologische Konsequenzen der ubiquitären Expression von I $\kappa$ B $\Delta$ N. Alle phänotypischen Veränderungen der I $\kappa$ B $\Delta$ N Tiere wurden auch bei den Nachkommen von Kreuzungen der loxP I $\kappa$ B $\Delta$ N Mäuse mit deleter-Cre Mäusen erhalten. loxP I $\kappa$ B $\Delta$ N Mäuse weisen dagegen keine phänotypischen Veränderungen auf und sind von Wildtyp Mäusen nicht zu unterscheiden.



	I $\kappa$ B $\alpha$ $\Delta$ N Mäuse	IoxPI $\kappa$ B $\alpha$ $\Delta$ N Mäuse	IoxPI $\kappa$ B $\alpha$ $\Delta$ N x del-Cre Mäuse
<b>Lebensdauer</b>	Max. 1 Jahr. 50% < 6 Monate.	gleich WT	gleich $\Delta$ N
<b>Grösse</b>	50 - 70% der WT-Grösse.	gleich WT	gleich $\Delta$ N
<b>Fortpflanzung</b>	♂ normal. ♀ reduzierte Würfe. Meist überleben nur WT-Nachkommen.	gleich WT	gleich $\Delta$ N
<b>ZNS</b>	Gleichgewichtsstörungen. Lethargie. Zittern. Übersprungshandlungen.	gleich WT	gleich $\Delta$ N
<b>Knochen und Zähne</b>	Osteopetrose. Gewölbte Schädel. Verzögertes Erscheinen der Nagezähne und Backenzähne. Im adulten Tier: Kein normaler Überbiss. Buckeligkeit. Knick im Schwanzende.	gleich WT	gleich $\Delta$ N
<b>Immunsystem</b>	Leukozytose. Granulozytose in 30%. Alynphoplasie. Beeinträchtigte Makrophagen-Aktivität; reduzierte NO Produktion.	gleich WT	gleich $\Delta$ N
<b>Ohren</b>	Chronische Otitis Media. Taubheit 4-6 Wochen nach der Geburt.	gleich WT	gleich $\Delta$ N
<b>Darm</b>	Max. 3 winzige Peyer's Patches (Alynphoplasie). Schwere Blutungen im Dünndarm, die zum Tode führen. Lose Struktur des Dünndarm-Epithels. Reduzierte Anzahl von Becherzellen.	gleich WT	gleich $\Delta$ N
<b>Haut</b>	Dünnes Fell. Teilweise kompletter Haarverlust in älteren Tieren. Alopezie auf Schwanz und hinter den Ohren. Nur ein Haartyp: "monotrich-awl". Reduzierte Anzahl der Haarfollikel. Defekte Entwicklung der Haarfollikel.	gleich WT	gleich $\Delta$ N
<b>Augen</b>	Augenöffnung später. Verdickte Lidränder. Trockene Augen. Keratokonjunktivitis sicca. Blindheit. Fehlen der Meibomschen Drüsen.	gleich WT	gleich $\Delta$ N

**Abbildung 1:** Genkarten der für die homologe Rekombination verwendeten Targeting Konstrukte, des Wildtyp  $\beta$ -Catenin Lokus und des  $\text{IkB}\alpha\Delta\text{N}$  Leserahmens. Die Integration der kodierenden cDNA der transdominanten negativen Mutante von humanem  $\text{IkB}\alpha$ ,  $\text{IkB}\alpha\Delta\text{N}$ , in den  $\beta$ -Catenin Lokus durch homologe Rekombination. (A) Der murine  $\beta$ -Catenin Lokus und Targeting Vektoren. Das  $\beta$ -Catenin Gen enthält 16 Exons.  $\text{IkB}\alpha\Delta\text{N}$  und  $\text{loxP-IkB}\alpha\Delta\text{N}$  wurden im korrekten Leserahmen mit dem endogenen Translations-Startcodon im zweiten Exon des  $\beta$ -Catenin Gens eingefügt. Die inserierten cDNA Konstrukte ersetzen die Exons 3 bis 6 des  $\beta$ -Catenin Gens und bewirken damit eine komplette Inaktivierung des  $\beta$ -Catenin Allels (Huelsenken, 2000). In der  $\text{loxP-IkB}\alpha\Delta\text{N}$  cDNA ist ein Stopcodon, welches am Anfang des Leserahmens eingefügt wurde, durch zwei loxP Sequenzen flankiert (schwarze Pfeile). (B) Expression von  $\text{IkB}\alpha\Delta\text{N}$  und  $\text{loxPIkB}\alpha\Delta\text{N}$ . Western Blot Analyse. Durch homologe Rekombination erhaltene  $\text{loxPIkB}\alpha\Delta\text{N}$  (D5-C7) und  $\text{IkB}\alpha\Delta\text{N}$  (D7-H9) ES Zell-Klone wurden für die Herstellung von Gesamtzellextrakten verwendet. Der im Western Blot verwendete Antikörper ( $\alpha\text{C-21}$ , #sc371, Santa Cruz) ist gegen den C-Terminus von  $\text{IkB}\alpha$  gerichtet. ns, unspezifisch. Molekularmassen-Standards sind angegeben. (C) Repression der Phorbolster-stimulierten DNA Bindungsaktivität von NF- $\kappa\text{B}$  durch  $\text{IkB}\alpha\Delta\text{N}$ . Gel Retardierungs-Assay von  $\text{IkB}\alpha\Delta\text{N}$  ES Klonen (G2 and G3), sowie von  $\text{loxPIkB}\alpha\Delta\text{N}$  ES Klonen (B7 and A3) vor Cre-Rekombinase-vermittelter Rekombination. Die ES-Zellklone wurden, wie angegeben, mit Phorbolster (PMA) behandelt oder unbehandelt belassen. Zur Inhibition spezifischer DNA-NF- $\kappa\text{B}$  Komplexe wurde der Bindungsreaktion anti-p65 Antikörper zugesetzt, wie angegeben. Der Gel Retardierungs-Assay wurde wie in Krappmann et al., 1996, beschrieben, durchgeführt. (D) Repression der Zytokin-stimulierten DNA Bindungsaktivität von NF- $\kappa\text{B}$  durch  $\text{IkB}\alpha\Delta\text{N}$ . Embryonale Fibroblasten (MEFs) von Wildtyp (WT) and  $\text{IkB}\alpha\Delta\text{N}$  Mäusen wurden mit IL1- $\beta$  and TNF $\alpha$  für die angegebenen Zeiten stimuliert und Extrakte im Gelretardierungs-Assay analysiert. (E) Die gleichen Extrakte wie in E wurden in Western Blots  $\text{IkB}\alpha$  and  $\beta$ -Catenin Proteinexpression untersucht, wie angegeben.

## Literatur

- Barnes, P.J. & Karin, M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases (1997). *N Engl J Med* 336, 1066-71
- DiSanto, J.P., Muller, W., Guy Grand, D., Fischer, A., and Rajewsky, K. (1995) Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 377-381.
- Gerondakis, S., Grossmann, M., Nakamura, Y., Pohl, T. & Grumont, R. (1999) Genetic approaches in mice to understand Rel/NF-kappaB and IkappaB function: transgenics and knockouts. *Oncogene* 18, 6888-95
- Gu, H., Marth, J.D., Orban, P.C., Mossmann, H., and Rajewsky, K. (1994) Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 265, 103-106.
- Haegel, H., Larue, L., Ohsugi, M., Fedorov, L., Herrenknecht, K., and Kemler, R. (1995) Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation. *Development* 121, 3529-3537.
- Hatada, E.N., Krappmann, D., and Scheidereit, C. (2000) NF- $\kappa$ B and the innate immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 12, 52-8.
- Hogan, B., Beddington, R. Costantini, F., Lacey, E. (1994) Manipulating the Mouse Embryo Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York,
- Huelsken J, Vogel R, Brinkmann V, Erdmann B, Birchmeier C, Birchmeier W. (2000) Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice. *J Cell Biol* 148, 567-78
- Hülsken, J., Birchmeier, W., and Behrens, J. (1994) E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. *J. Cell. Biol.* 127, 2061-2069.
- Krappmann, D., Wulczyn, F.G. and Scheidereit, C. (1996) Different mechanisms control signal-induced degradation and basal turnover of the NF- $\kappa$ B inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$  *in vivo*. *EMBO J.* 15, 6716-6726.
- Mayo, M.W. & Baldwin, A.S. (2000) The transcription factor NF-kappaB: control of oncogenesis and cancer therapy resistance. *Biochim Biophys Acta* 1470, M55-62
- Schwenk, F., Baron, U., and Rajewsky, K. (1995) A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucl. Acids Res.* 23, 5080-5081.
- Wang, C.Y., Cusack, J.C., Jr., Liu, R. & Baldwin, A.S., Jr. (1999) Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB. *Nat Med* 5, 412-7

- Wulczyn, F.G., Krappmann, D., and Scheidereit, C. (1996) The NF- $\kappa$ B/Rel and I $\kappa$ B gene families: mediators of immune response and inflammation *J. Mol. Med.* 74, 749-769.
- Zhang, Y., Riesterer, C., Ayrall, A.M., Sablitzky, F., Littlewood, T.D., and Reth, M. (1996) Inducible site-directed recombination in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 24, 543-548

**Patentansprüche:**

1. Genetisch verändertes, nicht-menschliches Säugetier, dadurch gekennzeichnet, daß seine somatischen und Keimzellen mindestens ein ubiquitär exprimierbares rekombinantes Regulatorgen tragen, dessen Genprodukt die Aktivität von NF- $\kappa$ B Transkriptionsfaktoren moduliert und damit zum Nachweis der Wirkung von Therapeutika oder Diagnostika NF- $\kappa$ B-assoziiierter Erkrankungen geeignet ist, wobei die biologische Aktivität des Regulatorgens von der Cre-Rekombinase kontrolliert wird.
2. Genetisch verändertes Säugetier nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet daß das Regulatorgen unter der Expressions-Kontrolle des endogenen  $\beta$ -Catenin Lokus steht.
3. Genetisch verändertes Säugetier nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Regulatorgen eine DNA-Sequenz ist, die für einen Inhibitor von NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren kodiert.
4. Genetisch verändertes Säugetier nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA Sequenz eine dominant negative Variante des Vertebraten I $\kappa$ B $\alpha$  Proteins kodiert, bei der für proteolytische Degradation notwendige Aminosäuren entweder deletiert oder mutiert sind.
5. Genetisch verändertes Säugetier nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um eine Maus oder Ratte handelt.
6. Verfahren zur Erzeugung des genetisch veränderten Säugetiers nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das unter der Kontrolle des endogenen Gens stehende Regulatorgen über homologe Rekombination in embryonale Stammzellen und Injektion dieser in Blastozysten und Übertragung letzterer in schwangere Tiere eingebracht wird.
7. Verwendung der Nachkommen einer Kreuzung eines genetisch veränderten Säugetiers nach einem der Ansprüche 1 bis 5 mit einem Cre-Rekombinase exprimierenden Säugetier für die Neu- und Weiterentwicklung therapeutischer und diagnostischer Methoden sowie zur Prüfung von geeigneten Arzneistoffen zur Therapie und Diagnostik NF- $\kappa$ B-assoziiierter Erkrankungen.

8. Verwendung von *in vitro* Zell-Kulturen aus Geweben der Nachkommen einer Kreuzung eines genetisch veränderten Säugetiers nach einem der Ansprüche 1 bis 5 mit einem Cre-Rekombinase exprimierenden Säugetier für die Neu- und Weiterentwicklung therapeutischer und diagnostischer Methoden sowie zur Prüfung von geeigneten Arzneistoffen zur Therapie und Diagnostik NF- $\kappa$ B-assoziierter Erkrankungen.

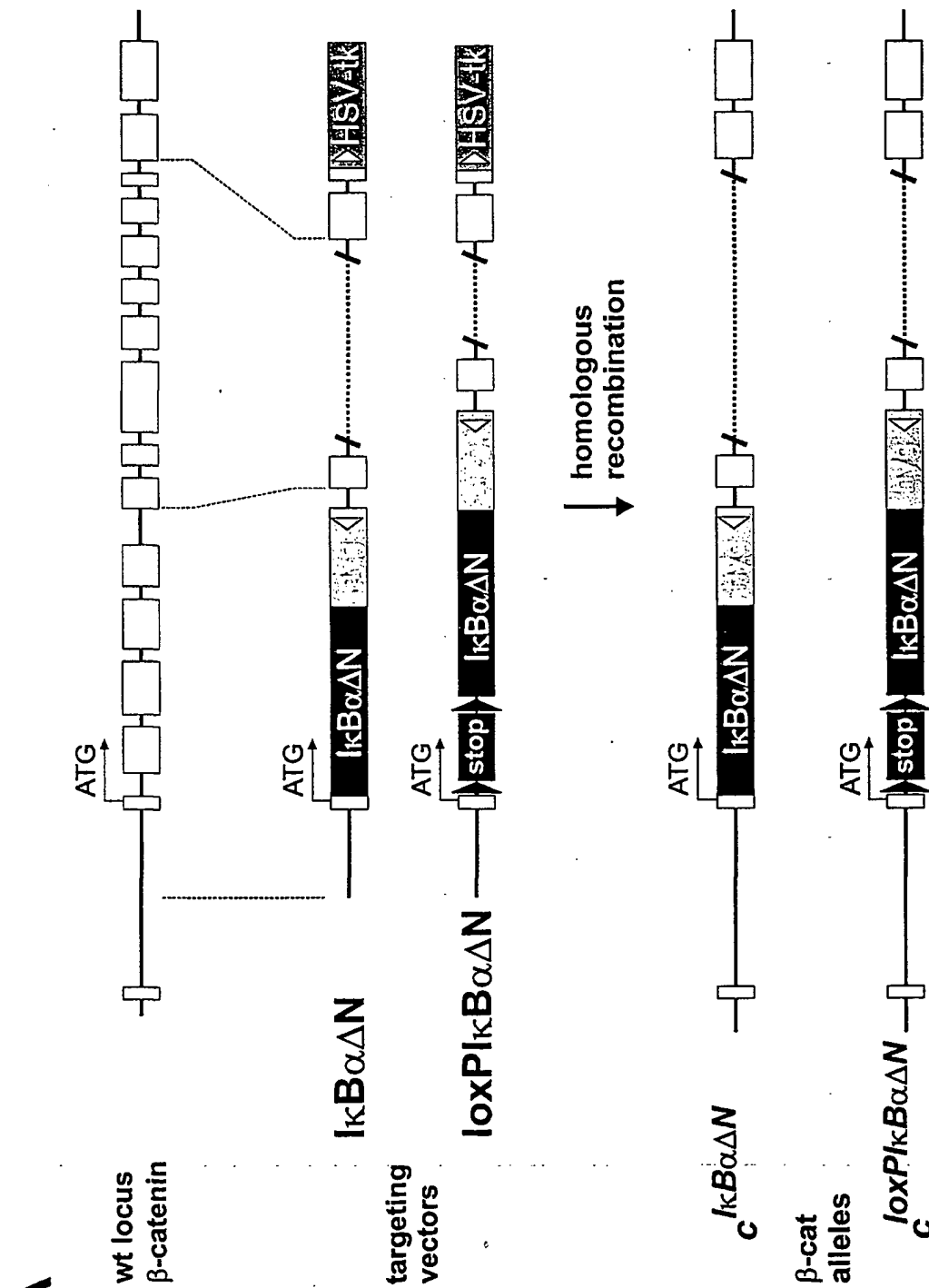


Abb. 1

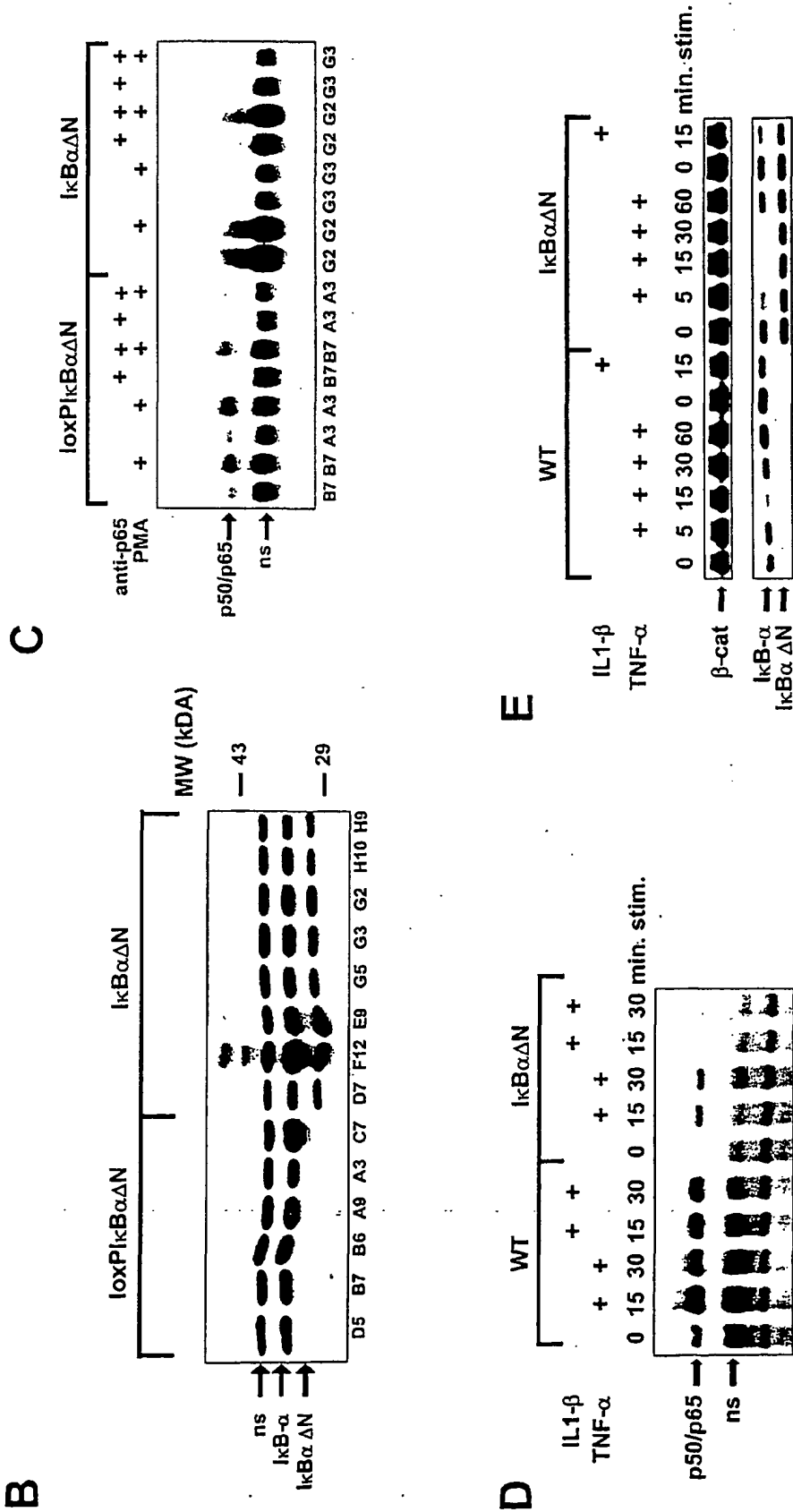


Abb. 1



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
28. Februar 2002 (28.02.2002)

PCT

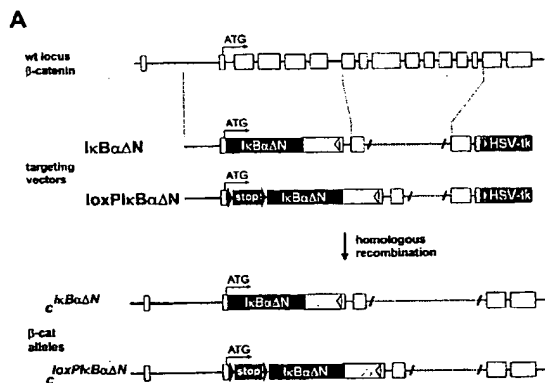
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/16573 A3**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **A01K 67/027**, **A61K 35/12** (71) **Anmelder** (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN** [DE/DE]; Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlin (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/DE01/03158** (72) **Erfinder; und**
- (22) Internationales Anmeldedatum: **24. August 2001 (24.08.2001)** (75) **Erfinder/Anmelder** (nur für US): **SCHEIDEREIT, Claus** [DE/DE]; Kantstrasse 22, 10623 Berlin (DE). **SCHMIDT-ULLRICH, Ruth** [DE/DE]; Leberstrasse 17, 10829 Berlin (DE).
- (25) Einreichungssprache: **Deutsch** (74) **Anwalt**: **BAUMBACH, Fritz**; Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlin (DE).
- (26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch** (81) **Bestimmungsstaat** (national): **US**.
- (30) Angaben zur Priorität:  
100 41 842.2 25. August 2000 (25.08.2000) DE

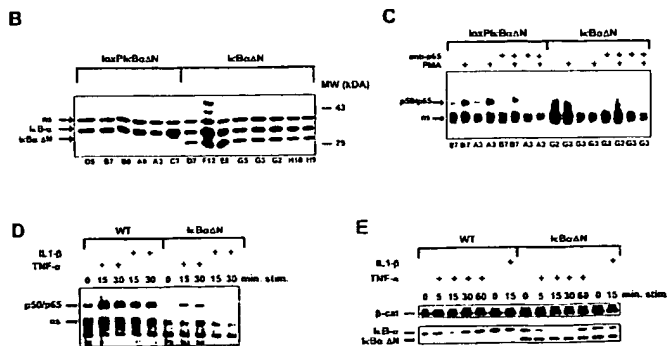
[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: GENETICALLY MODIFIED, NON-HUMAN MAMMAL CONTAINING AN ADDITIONAL INDUCIBLE REGULATOR GENE

(54) Bezeichnung: GENETISCH VERÄNDERTES, NICHT-MENSCHLICHES SÄUGETIER, DAS EIN ZUSÄTZLICHES INDUZIERBARES REGULATOR-GEN ENTHÄLT



(57) Abstract: The invention relates to a transgenic, non-human mammal, preferably a mouse, the body and sex cells thereof containing an inducible regulator gene which can be expressed in all cells. The biological activity of the regulator gene is only obtained after crossing with an animal having a recombinase (Cre) gene. Said regulator gene contains a stop codon situated before the translation starting site and flanked by loxP elements, in order to ensure the Cre-dependent expression thereof. The regulator gene is transmitted to the original animal by means of transfection, homologous recombination of embryonic stem cells and ensuing blastocyst micro-injection.



(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein transgenes, nicht-menschliches Säugetier, vorzugsweise eine Maus, dessen Körper- und Geschlechtszellen ein induzierbares Regulatorgen enthalten, welches in allen Zellen exprimiert werden kann. Die biologische Aktivität des Regulatorgens wird nur nach Kreuzung mit einem Rekombinase (Cre) - Gen-tragenden Tier erhalten. Das Regulatorgen enthält zur Gewährleistung seiner Cre-abhängigen Expression ein von loxP Elementen flankiertes Stop Kodon vor der Translations-Startstelle. Das Regulatorgen wurde dem Ursprungstier durch Transfektion und homologe Rekombination embryonaler Stammzellen und nachfolgender Blastozystenmikroinjektion übertragen.



(84) **Bestimmungsstaaten** (*regional*): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

(88) **Veröffentlichungsdatum des internationalen  
Recherchenberichts:**

20. Juni 2002

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.*

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DE 01/03158

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 A01K67/027 A61K35/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A01K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TALITHA R. BAKKER ET AL.: "Impaired Fetal Thymocyte Development After Efficient Adenovirus-Mediated Inhibition of nF-kB Activation" THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 162, 1999, pages 3456-3462, XP002188138 the whole document	1-8
X	BOOTHBY MARK R ET AL: "Perturbation of the T lymphocyte lineage in transgenic mice expressing a constitutive repressor of nuclear factor (NF)-kappa-B." JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 185, no. 11, 1997, pages 1897-1907, XP002051805 ISSN: 0022-1007 the whole document	1-8



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 January 2002

Date of mailing of the international search report

01/03/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Novak, S

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 01/03158

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>KRAPPMANN DANIEL ET AL: "Different mechanisms control signal-induced degradation and basal turnover of the NF-kappa-B inhibitor I-kappa-B-alpha in vivo."  EMBO (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION) JOURNAL,  vol. 15, no. 23, 1996, pages 6716-6726,  XP002188139  ISSN: 0261-4189  the whole document</p>	1-8
Y	<p>EMMERICH FLORIAN ET AL: "Overexpression of I kappa B alpha without inhibition of NF-kappaB activity and mutations in the I kappa B alpha gene in Reed-Sternberg cells."  BLOOD,  vol. 94, no. 9,  1 November 1999 (1999-11-01), pages  3129-3134, XP002188140  ISSN: 0006-4971  abstract; figures 3,4; tables 1-4</p>	1-8
Y	<p>EP 0 779 361 A (HOFFMANN LA ROCHE)  18 June 1997 (1997-06-18)  the whole document</p>	1-8
Y	<p>HUELSKEN JOERG ET AL: "Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice."  JOURNAL OF CELL BIOLOGY.,  vol. 148, no. 3,  7 February 2000 (2000-02-07), pages  567-578, XP002188141  ISSN: 0021-9525  abstract; figure 1</p>	1-8
A	<p>SLAUGENHAUPT SUSAN A ET AL:  "Tissue-specific expression of a splicing mutation in the IKBKAP gene causes familial dysautonomia."  AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS,  vol. 68, no. 3, March 2001 (2001-03),  pages 598-605, XP002188142  ISSN: 0002-9297</p>	
A	<p>SAUER B: "INDUCIBLE GENE TARGETING IN MICE USING THE CRE/LOX SYSTEM"  METHODS: A COMPANION TO METHODS IN ENZYMOLOGY, ACADEMIC PRESS INC., NEW YORK, NY, US,  vol. 14, no. 4, April 1998 (1998-04),  pages 381-392, XP001019712  ISSN: 1046-2023</p>	

-/--

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 01/03158

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>VAZQUEZ J C ET AL: "FACTORS AFFECTING THE EFFICIENCY OF INTRODUCING PRECISE GENETIC CHANGES IN ES CELLS BY HOMOLOGOUS RECOMBINATION: TAG-AND-EXCHANGE VERSUS THE CRE-LOXP SYSTEM"</p> <p>TRANSGENIC RESEARCH, LONDON, GB, vol. 7, no. 3, May 1998 (1998-05), pages 181-193, XP000864574 ISSN: 0962-8819</p> <p>---</p>	
A	<p>HATADA EUNICE N ET AL: "NF-kappaB and the innate immune response."</p> <p>CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY., vol. 12, no. 1, February 2000 (2000-02), pages 52-58, XP002188143 ISSN: 0952-7915</p> <p>---</p>	
P,X	<p>LUO JUN-LI ET AL: "Knock-in mice with a chimeric human/murine p53 gene develop normally and show wild-type p53 responses to DNA damaging agents: A new biomedical research tool."</p> <p>ONCOGENE, vol. 20, no. 3, 2001, pages 320-328, XP002188144 ISSN: 0950-9232 the whole document</p> <p>-----</p>	1-8

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 01/03158

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
EP 0779361	A	18-06-1997	BR	9606023 A	08-09-1998
			CA	2192738 A1	16-06-1997
			CN	1157828 A	27-08-1997
			EP	0779361 A2	18-06-1997
			JP	9216898 A	19-08-1997
			TR	970530 A2	21-07-1997
			US	6194175 B1	27-02-2001
<hr/>					

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/03158

**A. KLASSTFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
IPK 7 A01K67/027 A61K35/12

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A01K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen.

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	TALITHA R. BAKKER ET AL.: "Impaired Fetal Thymocyte Development After Efficient Adenovirus-Mediated Inhibition of nF-kB Activation" THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 162, 1999, Seiten 3456-3462, XP002188138 das ganze Dokument	1-8
X	BOOTHBY MARK R ET AL: "Perturbation of the T lymphocyte lineage in transgenic mice expressing a constitutive repressor of nuclear factor (NF)-kappa-B." JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, Bd. 185, Nr. 11, 1997, Seiten 1897-1907, XP002051805 ISSN: 0022-1007 das ganze Dokument	1-8



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*G\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. Januar 2002

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

01/03/2002

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Novak, S

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Batr. Anspruch Nr.
X	KRAPPMANN DANIEL ET AL: "Different mechanisms control signal-induced degradation and basal turnover of the NF-kappa-B inhibitor I-kappa-B-alpha in vivo." EMBO (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION) JOURNAL, Bd. 15, Nr. 23, 1996, Seiten 6716-6726, XP002188139 ISSN: 0261-4189 das ganze Dokument ----	1-8
Y	EMMERICH FLORIAN ET AL: "Overexpression of I kappa B alpha without inhibition of NF-kappaB activity and mutations in the I kappa B alpha gene in Reed-Sternberg cells." BLOOD, Bd. 94, Nr. 9, 1. November 1999 (1999-11-01), Seiten 3129-3134, XP002188140 ISSN: 0006-4971 Zusammenfassung; Abbildungen 3,4; Tabellen 1-4 ----	1-8
Y	EP 0 779 361 A (HOFFMANN LA ROCHE) 18. Juni 1997 (1997-06-18) das ganze Dokument ----	1-8
Y	HUELSKEN JOERG ET AL: "Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice." JOURNAL OF CELL BIOLOGY., Bd. 148, Nr. 3, 7. Februar 2000 (2000-02-07), Seiten 567-578, XP002188141 ISSN: 0021-9525 Zusammenfassung; Abbildung 1 ----	1-8
A	SLAUGENHAUPT SUSAN A ET AL: "Tissue-specific expression of a splicing mutation in the IKBKAP gene causes familial dysautonomia." AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, Bd. 68, Nr. 3, März 2001 (2001-03), Seiten 598-605, XP002188142 ISSN: 0002-9297 ----- -/--	



## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	SAUER B: "INDUCIBLE GENE TARGETING IN MICE USING THE CRE/LOX SYSTEM" METHODS: A COMPANION TO METHODS IN ENZYMOLOGY, ACADEMIC PRESS INC., NEW YORK, NY, US, Bd. 14, Nr. 4, April 1998 (1998-04), Seiten 381-392, XP001019712 ISSN: 1046-2023 ----	
A	VAZQUEZ J C ET AL: "FACTORS AFFECTING THE EFFICIENCY OF INTRODUCING PRECISE GENETIC CHANGES IN ES CELLS BY HOMOLOGOUS RECOMBINATION: TAG-AND-EXCHANGE VERSUS THE CRE-LOXP SYSTEM" TRANSGENIC RESEARCH, LONDON, GB, Bd. 7, Nr. 3, Mai 1998 (1998-05), Seiten 181-193, XP000864574 ISSN: 0962-8819 ----	
A	HATADA EUNICE N ET AL: "NF-kappaB and the innate immune response." CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY., Bd. 12, Nr. 1, Februar 2000 (2000-02), Seiten 52-58, XP002188143 ISSN: 0952-7915 ----	
P,X	LUO JUN-LI ET AL: "Knock-in mice with a chimeric human/murine p53 gene develop normally and show wild-type p53 responses to DNA damaging agents: A new biomedical research tool." ONCOGENE, Bd. 20, Nr. 3, 2001, Seiten 320-328, XP002188144 ISSN: 0950-9232 das ganze Dokument -----	1-8

# INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/03158

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0779361 A	18-06-1997	BR 9606023 A	08-09-1998
		CA 2192738 A1	16-06-1997
		CN 1157828 A	27-08-1997
		EP 0779361 A2	18-06-1997
		JP 9216898 A	19-08-1997
		TR 970530 A2	21-07-1997
		US 6194175 B1	27-02-2001
-----			